

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-9992

(43) 公開日 平成8年(1996)1月16日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/00	B	9282-4B		
C 0 7 K 1/34		8318-4H		

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平6-169069

(22) 出願日 平成6年(1994)6月28日

(71) 出願人 000005452

日立プラント建設株式会社

東京都千代田区内神田1丁目1番14号

(72) 発明者 福島 幸生

東京都千代田区内神田1丁目1番14号 日

立プラント建設株式会社内

(72) 発明者 昆 正浩

東京都千代田区内神田1丁目1番14号 日

立プラント建設株式会社内

(72) 発明者 田中 明雄

東京都千代田区内神田1丁目1番14号 日

立プラント建設株式会社内

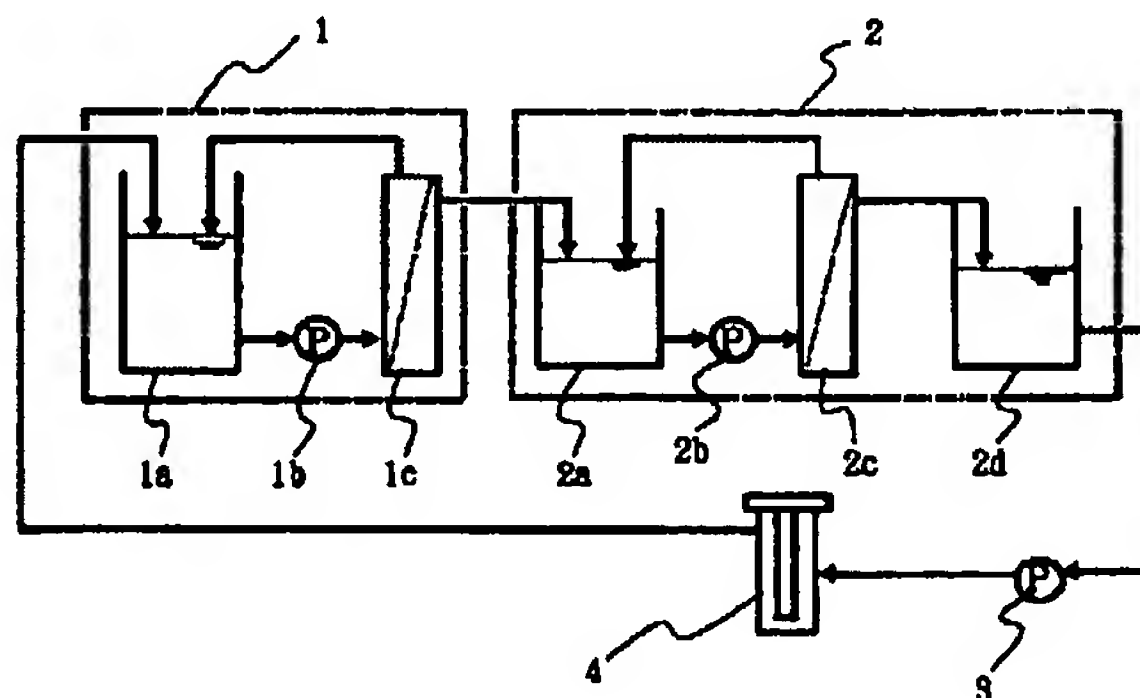
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛋白質の回収方法

(57) 【要約】

【目的】 細胞培養液から低コストで効率よく蛋白質を回収しうる方法を提供すること。

【構成】 微生物あるいは動物細胞が浮遊している液体から蛋白質を分離回収する方法において、該液体を精密濾過装置1を用いて濾過し、蛋白質を含む濾液を限外濾過装置2で濃縮濾過し、限外濾過装置2の濾液を精密濾過装置1の原液に添加することを特徴とする蛋白質の回収方法である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 微生物あるいは動物細胞が浮遊している液体から蛋白質を分離回収する方法において、該液体を精密濾過装置を用いて濾過し、蛋白質を含む濾液を限外濾過装置で濃縮濾過し、限外濾過装置の濾液を精密濾過装置の原液に添加することを特徴とする蛋白質の回収方法。

【請求項 2】 限外濾過装置の濾液流量が精密濾過装置の濾液流量以上となるように、限外濾過装置の膜面積を設定する請求項 1 記載の蛋白質の回収方法。

【請求項 3】 限外濾過装置の濾液に紫外線を照射して殺菌した後、精密濾過装置の原液に添加する請求項 1 又は 2 記載の蛋白質の回収方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、医薬品、酵素剤、食品などとして利用される蛋白質をバイオテクノロジーにより製造する工程において、膜で目的蛋白質を微生物や動物などの細胞から分離回収する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年のバイオテクノロジーの発展に伴 \*

酵素蛋白質回収率 = 原液の回収率 × 酵素蛋白質透過率

$$= (1 - 1/5) \times 0.7 = 0.56 \quad \dots (1)$$

【0004】一方、工業的には原液からの蛋白質回収率を 0.9 以上にすることが望まれている。このため、精密濾過装置から蛋白質を回収する場合には、原液に蛋白質を含まない液を加えて濾過し、徐々に蛋白質を押し出すようにしている。このとき加える液を加水液と呼ぶことにする。加水液には水道水を使用できない。これは、水道水で加水すると、原液のイオン強度が低下するため、蛋白質が膜と静電的に吸着したり、他の蛋白質や溶存物と静電的に結合し、巨大分子になって膜を透過しにくくなるためである。このため、通常、加水液には塩化ナトリウム、塩化カリウムなどの塩類を用いて蛋白質と他の物質との吸着を防ぎ、膜からの蛋白質透過率が高くなるようにしている。さらに、蛋白質が沈殿することを避けるため、pH を調整することもある。

【0005】加水液量は、膜からの蛋白質透過率によって異なるが、原液量を工業的生産規模の  $50 \text{ m}^3$  / バッチとした場合、 $50 \text{ m}^3$  から  $200 \text{ m}^3$  の加水液が必要になる。また、塩類濃度は 0.5 % から 5 % にする必要があるため、1 バッチ当たり 0.25 t から 10 t の塩類が必要になる。年間 200 バッチの生産としても、一年間に  $50 \text{ t}$  から  $2000 \text{ t}$  の塩類を使用し、 $10000 \text{ m}^3$  から  $40000 \text{ m}^3$  の塩類を含んだ廃水が排出されることとなる。このため、加水液に用いる塩類のコスト及びその廃水処理に要するコストが高いことが重大な問題になっている。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、前記

\* い、微生物や動物細胞など（以下、微生物も含めて単に細胞と記すことがある）を用いた蛋白質の生産が増加している。これらの製造工程のほとんどには、目的蛋白質を細胞から分離する工程が含まれている。目的蛋白質を細胞から分離する場合には、細胞を完全に除去できる膜分離装置が利用されることが多い。

【0003】現在、細胞と蛋白質との分離には、中空糸形あるいは管形の膜モジュールが使用されている。これは、パイプ状の膜の内筒部分に細胞と蛋白質を含む培養液を加圧して送り、膜の孔径より大きくて膜を透過できない細胞と、膜の孔径より小さくて膜を透過できる蛋白質とを分離できるようにしたものである。しかしながら、このような膜モジュールを用いた膜分離装置では、膜からの蛋白質透過率が低いことが欠点である。特開平 5 - 23194 号公報には、孔径  $0.1 \mu\text{m}$  の精密濾過装置で微生物から酵素蛋白質を回収する方法が示されているが、膜からの酵素蛋白質透過率は 0.7 に止まっている。したがって、原液を 1/5 に濃縮しても酵素蛋白質回収率は、(1) 式に示すように 0.56 と低い値になる。

従来技術の欠点を解消し、細胞培養液から低コストで効率よく蛋白質を回収しうる方法を提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】精密濾過装置の濾液として回収された蛋白質は、通常、限外濾過装置などでさらに濃縮されて製品になる。この際、培養液中に含まれる水分や塩類は廃液として排出される。一般に、微生物や動物細胞の培養液中では目的蛋白質は細胞外に代謝されることが多く、また、精密濾過装置での蛋白質の透過率を高くするために、培養液中には塩類が加えられたり、pH が調整されていることが多い。したがって、精密濾過装置後段の濃縮装置からの廃液は、蛋白質が溶解しやすい状態になっていることが多い。本発明は、この廃液を再利用することに着目し、精密濾過装置の濾液を限外濾過装置で濃縮濾過し、蛋白質を溶解しやすい状態になっている濾液を得て、これを精密濾過装置の加水液として用いるようにしたものである。

【0008】すなわち、本発明による蛋白質の回収方法は、微生物あるいは動物細胞が浮遊している液体から蛋白質を分離回収するため、該液体を精密濾過装置を用いて濾過し、蛋白質を含む濾液を限外濾過装置で濃縮濾過し、限外濾過装置の濾液を精密濾過装置の原液に返送することを特徴とする。

【0009】また、本発明の方法において、精密濾過装置と限外濾過装置の流量バランスを保つため、限外濾過装置の濾液流量を精密濾過液の流量以上になるように、限外濾過装置の膜面積を設定するのが好ましい。さら

に、限外濾過装置の濾液中には培地に起因する有機物が多量に含まれているので、雑菌の繁殖を防ぐため、紫外線で殺菌するのが好ましい。

#### 【0010】

【発明の実施例】次に、図面を参照して本発明を実施例に基づいてさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。図1は、本発明の一実施例を示す蛋白質の回収方法の略示系統図である。図1に示したように、本発明の方法を実施する装置は、精密濾過装置1、限外濾過装置2、返送ポンプ3及び紫外線照射装置

4で構成される。精密濾過装置1は、細胞培養液の受槽である原液貯槽1aと加圧循環ポンプ1bと精密濾過膜モジュール1cとから成る。また、限外濾過装置2は、精密濾過装置1の濾液の受槽である原液貯槽2a、加圧循環ポンプ2b、限外濾過膜モジュール2c及び濾液貯槽2dから成る。紫外線照射装置4では、殺菌効果がある波長245nmの紫外線を照射する。

【0011】図1に示した装置で本発明方法を実施する場合、蛋白質を含む細胞培養液は、まず、精密濾過装置1の原液貯槽1aに投入される。次に、加圧循環ポンプ1bによって精密濾過膜モジュール1cに送られる。ここで、一部は精密濾過膜を透過して濾液となり、限外濾過装置2の原液貯槽2aに回収される。また、一部は濃縮液として原液貯槽1aに循環される。細胞培養液中の細胞は、径が大きいので、精密濾過膜で阻止されて濃縮液中に残る。蛋白質は溶解しているため、精密濾過膜を透過し、限外濾過装置2に送られる。

【0012】限外濾過装置2の運転は、原液貯槽2aが所定の液量に達した時点から開始する。具体的には、概ね、精密濾過装置1で細胞培養液が2/3から1/2に濃縮され、その濾液が原液貯槽2aに蓄えられた時点で運転を開始する。なお、細胞培養液の粘度が高く、濃縮が困難な場合には、原液貯槽1a中の細胞培養液に新たに加水液を加えてもよい。この場合には、加水の添加量が、概ね、培養液量の1/3から1/2に達した時点で、限外濾過装置2の運転を開始する。

【0013】限外濾過装置2では、蛋白質を含む精密濾過装置1の濾液は、加圧循環ポンプ2bによって、原液貯槽2aから限外濾過膜モジュール2cに送られる。ここで、一部は限外濾過膜を透過して濾液貯槽2dに回収される。また、一部は濃縮液として、原液貯槽2aに循環される。原液中の蛋白質は、分子量が大きいので限外濾過膜を透過できず、原液貯槽2aに循環され、濃縮される。塩類などの低分子物質は、水分とともに限外濾過膜を透過し、濾液貯槽2dに送られる。なお、原液貯槽

2a中に濃縮された蛋白質は、クロマトグラフィー等の次工程に送られる。

【0014】本発明の方法においては、濾液貯槽2d中に回収された塩類と水分とは、返送ポンプ3で精密濾過装置の原液貯槽1aに返送される。返送流量は、原液貯槽1aに設けられたレベルセンサを用いて返送ポンプ3の回転数を制御し、原液貯槽1aのレベルが所定の値に維持されるように調節する。また、返送配管の途中に紫外線照射装置4を設置し、雑菌を殺菌して雑菌によって原液貯槽1a中の蛋白質が資化されることを防ぐ。

【0015】前記実施例では、回分式手法で蛋白質の回収を行ったが、同一装置を用いて連続式運転も可能である。また、紫外線照射装置4を返送ポンプ3と原液貯槽1aの間に設置したが、濾液貯槽2d内に設置してもよい。さらに、限外濾過装置2の濾液に新たな塩類を加えることによって特に蛋白質の溶解が促進される場合には、濾液貯槽2d又は原液貯槽1aに塩類（いわゆるカオトロピックイオン）を加えてもよい。

【0016】以上のように、本発明によれば、精密濾過装置1への加水液に、後段に設置された蛋白質の濃縮装置である限外濾過装置2の濾液（廃液）を返送して用いることによって加水液に必要な塩類の購入コスト及びその処理コストを削減できる。なお、返送ポンプ3、紫外線照射装置4及び配管を新たに設置する必要があるが、そのコストは、塩類購入などのコスト削減分によって3～6ヶ月で回収できる。

#### 【0017】

【発明の効果】本発明によれば、加水液に必要な塩類の購入コスト及び廃液の処理コストを著しく削減でき、低コストで蛋白質を効率よく回収することができる。

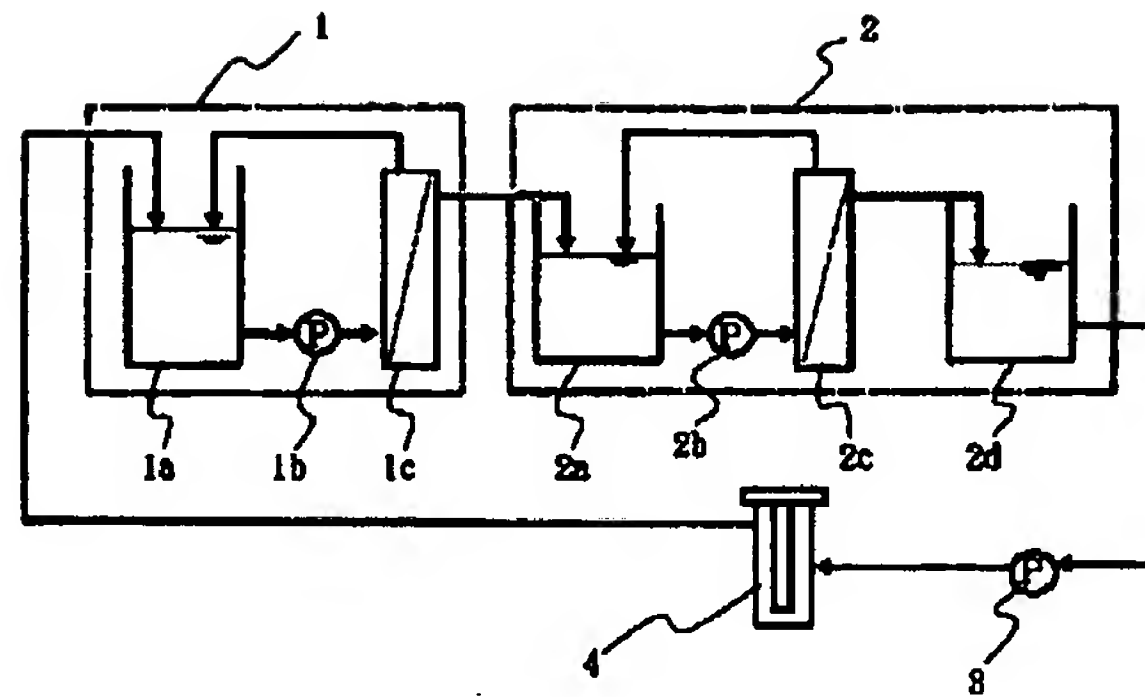
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法を実施する装置の略示系統図である。

#### 【符号の説明】

- 1 精密濾過装置
- 1a 原液貯槽
- 1c 精密濾過膜モジュール
- 2 限外濾過装置
- 2a 原液貯槽
- 2b 加圧循環ポンプ
- 2c 限外濾過膜モジュール
- 2d 濾液貯槽
- 3 返送ポンプ
- 4 紫外線照射装置

【図 1】



フロントページの続き

(72)発明者 伊藤 真実  
東京都千代田区内神田 1 丁目 1 番 14 号 日  
立プラント建設株式会社内

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-009992

(43)Date of publication of application : 16.01.1996

(51)Int.Cl.

C12P 21/00  
C07K 1/34

(21)Application number : 06-169069

(71)Applicant : HITACHI PLANT ENG &amp; CONSTR CO LTD

(22)Date of filing : 28.06.1994

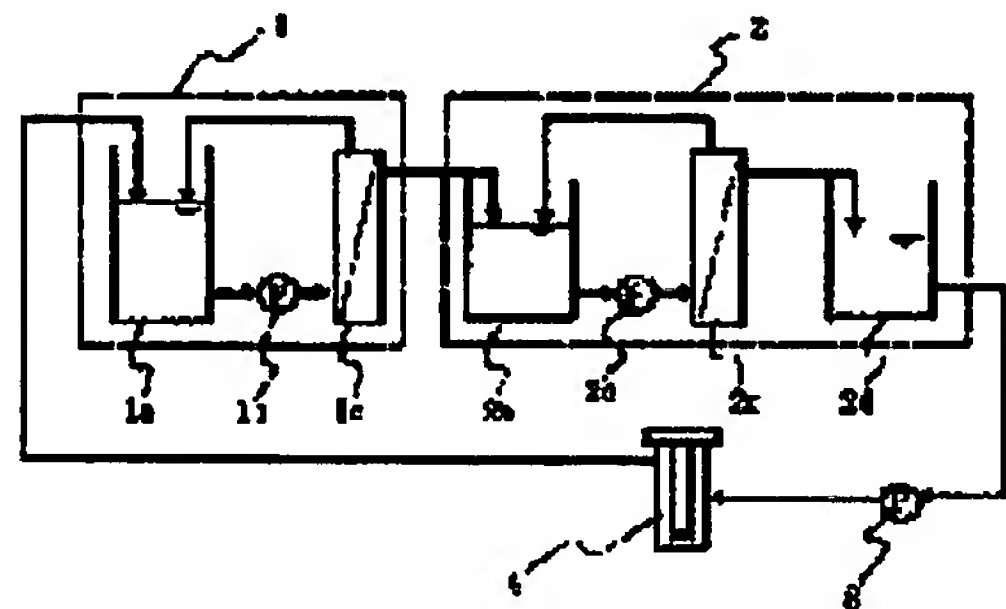
(72)Inventor : FUKUSHIMA YUKIO  
KON MASAHIRO  
TANAKA AKIO  
ITO MASAMITSU

## (54) METHOD FOR RECOVERING PROTEIN

## (57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for recovering a protein by which the protein can efficiently be recovered from a cell culture solution at a low cost.

CONSTITUTION: This method for recovering a protein is to filter a liquid containing a microorganism or an animal cell suspended therein through a precise filter device 1, concentrate and filter the resultant filtrate containing the protein through an ultrafiltration device 2 and add the prepared filtrate from the ultrafiltration device 2 to a stock solution for the precise filter device 1 in a method for separating and recovering the protein from the liquid containing the microorganism or animal cell.





**\* NOTICES \***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

**[Claim(s)]**

[Claim 1] The recovery approach of the protein which filters this liquid using a precision filter in the approach of carrying out separation recovery of the protein from the liquid with which the microorganism or the animal cell is floating, carries out concentration filtration of the filtrate containing protein with a ultrafiltration equipment, and is characterized by adding the filtrate of a ultrafiltration equipment to the undiluted solution of a precision filter.

[Claim 2] The recovery approach of protein according to claim 1 of setting up the film surface product of a ultrafiltration equipment so that the filtrate flow rate of a ultrafiltration equipment may turn into more than the filtrate flow rate of a precision filter.

[Claim 3] The recovery approach of the protein according to claim 1 or 2 added to the undiluted solution of a precision filter after irradiating ultraviolet rays and sterilizing them to the filtrate of a ultrafiltration equipment.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

**[Detailed Description of the Invention]****[0001]**

**[Industrial Application]** This invention relates to the approach of carrying out separation recovery of the purpose protein from cells, such as a microorganism and an animal, by the film in the process which manufactures with biotechnology the protein used as drugs, an enzyme agent, food, etc.

**[0002]**

**[Description of the Prior Art]** Production of the protein using a microorganism, an animal cell (it may only be hereafter described as a cell also including a microorganism), etc. is increasing with development of biotechnology in recent years. In most of these production processes, the process which separates the purpose protein from a cell is included. When separating the purpose protein from a cell, the membrane separation device from which a cell is completely removable is used in many cases.

**[0003]** The membrane module of hollow filament form or tubing type is used for separation with current, a cell, and protein. This enables it to separate the cell which pressurizes the culture medium which contains a cell and protein in the container liner part of the pipe-like film, is larger than the aperture of delivery and the film and cannot penetrate the film, and the protein which is smaller than a membranous aperture and can penetrate the film. However, in the membrane separation device using such a membrane module, it is a fault that the protein permeability from the film is low. Although the approach the precision filter of 0.1 micrometers of apertures recovers an enzyme protein from a microorganism is shown in JP,5-23194,A, the enzyme protein permeability from the film has stopped at 0.7. Therefore, even if it condenses an undiluted solution to one fifth, enzyme protein recovery becomes 0.56 and a low value, as shown in (1) type.

Enzyme protein recovery = recovery x enzyme protein permeability of an undiluted solution =  $(1-1/5) \times 0.7 = 0.56 \dots (1)$

**[0004]** To, make protein recovery from an undiluted solution or more into 0.9 industrially on the other hand is desired. For this reason, in collecting protein from a precision filter, he adds and filters the liquid which does not contain protein in an undiluted solution, and is trying to extrude protein gradually. The liquid added at this time will be called adding-water liquid. Tap water cannot be used for adding-water liquid. If it adds water with tap water, since the ionic strength of an undiluted solution will fall, this is because protein adsorbs in static electricity with the film, or it combines with other protein or a dissolved object in static electricity, it becomes a macromolecule and it is hard coming to penetrate the film. For this reason, in adding-water liquid, he prevents adsorption with protein and other matter using salts, such as a sodium chloride and potassium chloride, and is trying for the protein permeability from the film to usually become high. Furthermore, since it avoids that protein precipitates, pH may be adjusted.

**[0005]** the case where the amount of undiluted solutions is used as 50m3 / batch of a industrial production scale although adding-water volume changed with protein transmission from the film — 50m3 from — 200m3 Adding-water liquid is needed. Moreover, since it is necessary to make salts concentration 5% from 0.5%, 0.25 to 10t salts are needed. [ per one batch ] as production of annual 200 batch — one year — 50 to 2000t salts — using it — 10000m3 from — 40000m3 The waste water containing salts will be discharged. For this reason, it has been a serious problem that the cost which the cost of the salts used for adding-water liquid and its waste water treatment take is high.

**[0006]**

**[Problem(s) to be Solved by the Invention]** The purpose of this invention cancels the fault of said conventional technique, and is to offer the approach that protein can be efficiently collected from cell culture liquid by low cost.

**[0007]**

**[Means for Solving the Problem]** The protein collected as filtrate of a precision filter is further condensed with a ultrafiltration equipment etc., and usually becomes a product. Under the present circumstances, the moisture and salts which are contained in culture medium are discharged as waste fluid. Generally, in the culture medium of a microorganism or an animal cell, in order that the purpose protein may be metabolized besides a cell in many cases and may make the permeability of the protein in a precision filter high, salts are added into culture medium or pH is adjusted in many cases. Therefore, the waste fluid from the concentration equipment of the precision filter latter part is in the condition of being easy to dissolve protein, in many cases. Paying attention to reusing this waste fluid, this invention carries out concentration filtration of the filtrate of a precision filter with a ultrafiltration equipment, obtains \*\*\*\*\* filtrate in the condition of being easy to dissolve protein, and this is used for it as adding-water liquid of a precision filter.

[0008] That is, in order that the recovery approach of the protein by this invention may carry out separation recovery of the protein from the liquid with which the microorganism or the animal cell is floating, it filters this liquid using a precision filter, carries out concentration filtration of the filtrate containing protein with a ultrafiltration equipment, and is characterized by returning the filtrate of a ultrafiltration equipment to the undiluted solution of a precision filter.

[0009] Moreover, in the approach of this invention, in order to maintain the flow rate balance of a precision filter and a ultrafiltration equipment, it is desirable to set up the film surface product of a ultrafiltration equipment so that it may become about the filtrate flow rate of a ultrafiltration equipment more than the flow rate of precision filtrate. Furthermore, since the organic substance resulting from a culture medium is contained so much in the filtrate of a ultrafiltration equipment, in order to prevent propagation of saprophytic bacteria, sterilizing by ultraviolet rays is desirable.

[0010]

[Example] Next, although this invention is further explained to a detail based on an example with reference to a drawing, this invention is not limited to this. Drawing 1 is the sketch schematic diagram of the proteinic recovery approach which shows one example of this invention. As shown in drawing 1, the equipment which enforces the approach of this invention consists of the precision filter 1, a ultrafiltration equipment 2, a return pump 3, and a black light 4. The precision filter 1 consists of undiluted solution tank 1a and pressurization circulating-pump 1b which are the receiver tank of cell culture liquid, and precision filtration membrane module 1c. Moreover, a ultrafiltration equipment 2 consists of undiluted solution tank 2a [ which is the receiver tank of the filtrate of the precision filter 1 ], pressurization circulating-pump 2b, and ultrafiltration membrane module 2c, and 2d of filtrate tanks. In a black light 4, the ultraviolet rays which are the wavelength of 245nm with a bactericidal effect are irradiated.

[0011] When enforcing this invention approach with the equipment shown in drawing 1, the cell culture liquid containing protein is first thrown into undiluted solution tank 1a of the precision filter 1. Next, it is sent to precision filtration membrane module 1c by pressurization circulating-pump 1b. Here, a part penetrates a micro filter, serves as filtrate, and are collected by undiluted solution tank 2a of a ultrafiltration equipment 2. Moreover, it circulates through a part to undiluted solution tank 1a as concentration liquid. Since the cell in cell culture liquid has the large path, it is prevented by the micro filter and remains into concentration liquid. Since protein is dissolving, it penetrates a micro filter and is sent to a ultrafiltration equipment 2.

[0012] Operation of a ultrafiltration equipment 2 is started from the time of undiluted solution tank 2a reaching predetermined volume. In general, cell culture liquid is condensed from 2/3 to 1/2 with the precision filter 1, and when the filtrate is stored in undiluted solution tank 2a, specifically, operation is started. In addition, the viscosity of cell culture liquid is high, and when concentration is difficult, adding-water liquid may newly be added to the cell culture liquid in undiluted solution tank 1a. In this case, when the addition of maceration amounts to 1/2 from 1/3 of the amount of culture medium in general, operation of a ultrafiltration equipment 2 is started.

[0013] In a ultrafiltration equipment 2, the filtrate of the precision filter 1 containing protein is sent to ultrafiltration membrane module 2c from undiluted solution tank 2a with pressurization circulating-pump 2b. Here, a part penetrates ultrafiltration membrane and are collected by 2d of filtrate tanks. Moreover, it circulates through a part to undiluted solution tank 2a as concentration liquid. Since the protein in an undiluted solution has large molecular weight, it cannot penetrate ultrafiltration membrane, but it is circulated through and condensed by undiluted solution tank 2a. Low-molecular matter, such as salts, penetrates ultrafiltration membrane with moisture, and is sent to 2d of filtrate tanks. In addition, the protein condensed in undiluted solution tank 2a is sent to degree processes, such as a chromatography.

[0014] In the approach of this invention, the salts and the moisture which were collected in 2d of filtrate tanks are returned to undiluted solution tank 1a of a precision filter with the return pump 3. A return flow rate controls the engine speed of the return pump 3 using the level sensor formed in undiluted solution tank 1a, and it adjusts it so that the level of undiluted solution tank 1a may be maintained by the predetermined value. Moreover, it prevents installing a black light 4 in the middle of return piping, sterilizing saprophytic bacteria, and carrying out utilization of the protein in undiluted solution tank 1a with saprophytic bacteria.

[0015] Although said example recovered protein by the batch process technique, continuous system operation is also possible using the same equipment. Moreover, although the black light 4 was installed between the return pump 3 and undiluted solution tank 1a, you may install in 2d of filtrate tanks. Furthermore, when the dissolution of protein is promoted especially by adding new salts to the filtrate of a ultrafiltration equipment 2, salts (the so-called chaotropic ion) may be added to 2d of filtrate tanks, and undiluted solution tank 1a.

[0016] As mentioned above, according to this invention, the purchase cost and its processing cost of salts required for adding-water liquid are reducible by returning and using for the adding-water liquid to the precision filter 1 the filtrate (waste fluid) of the ultrafiltration equipment 2 which is concentration equipment of the protein installed in the latter part. In addition, although it is necessary to newly install the return pump 3, a black light 4, and piping, the cost is recoverable with parts for cost reduction, such as salts purchase, in 3 - six months.

[0017]

[Effect of the Invention] According to this invention, the purchase cost of salts required for adding-water liquid and the processing cost of waste fluid can be reduced remarkably, and protein can be efficiently collected by low cost.



[Translation done.]